

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
前島精治	主査 教授 森 浩 志 副査 教授 清 金 公 裕 副査 教授 上 田 晃 一 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 田 窪 孝 行
主論文題名 Establishment and characterization of a cell line (DEOC-1) originating from a human malignant melanoma of the skin (ヒト皮膚悪性黒色腫由来培養細胞株 (DEOC-1) の樹立とその性状)	
学位論文内容の要旨	
<p>《緒言》</p> <p>悪性黒色腫は現在選択可能な治療法に抵抗性の、高度悪性腫瘍であり、基礎的研究のためにその細胞株の樹立が重要である。申請者はヒト悪性黒色腫細胞株(DEOC-1)の樹立に成功し、その細胞生物学的特性を明らかにした。</p> <p>《対象および方法》</p> <p>原腫瘍は 59 歳男性の右腫部に発生した直径 6cm の悪性黒色腫で、摘出腫瘍組織片を細切後 0.25% trypsin 溶液で処理し、培養液(Ham's F12 培地+10%牛胎児血清+抗生剤)に浮遊させ、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置して単層培養した。</p> <p>培養細胞の形態学的検討は倒立顕微鏡で観察するとともに、エタノール固定・パピニコロウ染色標本を鏡検した。細胞増殖能は培養細胞の増殖曲線から求め、コロニー形成率は植え込んだ浮遊単離細胞と 14 日後に形成されたコロニー数との比率で計算した。染色体分析は分裂中期細胞について、An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995) に準じて行った。異種移植実験として、浮遊単離細胞を SCID マウス背部皮下に接種し、2 週間後形成された直径 5mm の腫瘍を採取して光顕および電顕で観察した。メラノーマ細胞同定のために S100 と HMB45 に対する免疫組織化学染色を行い、その発色はメラニンとの鑑別のために TrueBlue substrate® を使用し、核染色には Contrast red® を使用した。</p> <p>腫瘍細胞の発現する腫瘍マーカーとして、培養上清中の AFP・CA125・CA19-9・CA72-4・CEA・HCG・SCC・TPA・5-S-cysteinyldopa(5-S-CD)を測定した。メラニン産生に対するチロジンの効果は、異なる濃度のチロジンを培養液に添加して、上清中の 5-S-CD 濃度に生じる変化を測定することによって判定した。また、抗癌剤(ACD, ACNU, ADM, BLM, CBCDA, CDDP, CPM, DTIC, 5FU, MMC, MTX, VLB, VCR, VP-16)の感受性を MTT assay 法で行い、50%増殖抑制濃度(EC50)を算定した。</p> <p>多剤耐性遺伝子の発現として、MDR1 (multidrug resistance gene 1), MRP1 (multidrug resistance associated protein 1), LRP (lung resistance-related protein) に対する各抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、各蛋白の発現を検討した。さらに RT-PCR 法を用いて MDR1, MRP1, LRP 各 mRNA の発現を検討した。</p>	

## 《結果》

原腫瘍細胞の核は円形から卵円形で、淡明ないし好塩基性の細胞質に褐色顆粒が存在した。細胞株の樹立過程で、初代培養後しばらくは線維芽細胞の混入を認めたが、継代を重ねるにつれて消失した。論文投稿時点で、DEOC-1は84ヶ月50代以上継代されている。褐色顆粒の量は継代するにつれて徐々に減少した。

培養細胞は紡錘形ないし多稜形で、細胞増殖の接触阻止は認められなかった。また、卵円形の核に核小体を複数個有し、細胞質に褐色顆粒を認め、多核巨細胞も観察された。褐色色素産生はフラスコを通して肉眼でも確認できた。継代6代目と20代目の増殖曲線を作成したところ、継代するにつれて成長は遅くなった。染色体数は幅広く異数性に存在し3倍体にモードを呈した。また、異種移植可能で、形成された腫瘍は原腫瘍と類似の組織像を呈した。電顕的観察で細胞質内に premelanosome が多数認められた。免疫組織化学染色では原腫瘍、異種移植腫瘍、DEOC-1 のいずれも S100 と HMB-45 が陽性であった。

術後患者の血清中の 5-S-CD 値は 7nM (normal value: 4.4±1.8nM)、DEOC-1 の培養 7 日目の培養液中の 5-S-CD 値は 3.9nM (control; 0.1nM)であった。検討した腫瘍マーカー値は細胞を培養しない対照液と比べて同じく正常範囲であった。培養液中のチロジン濃度を上げると 5-S-CD 値は著明に上昇した。

検討したすべての抗癌剤で、MTT assay 法による薬剤感受性を認めなかった。原腫瘍、異種移植腫瘍および DEOC-1 に MDR-1, MRP1 および LRP の蛋白と mRNA の発現を認めた。

## 《考察》

樹立細胞は下記の特性を示した:①培養材料がヒト皮膚悪性黒色腫由来である。②84ヶ月間、50回以上にわたり継代可能である。③細胞異型を示し、接触阻止を示さず容易に重積する。④染色体検査では、核型がヒト型で異数性の分布をとる。⑤SCID マウスに移植可能で、原腫瘍と類似の腫瘍を形成する。⑥細胞質内にメラニン顆粒を有し 5-S-CD を産生する。以上のことから、DEOC-1 がヒト皮膚悪性黒色腫由来培養細胞と確認された。

DEOC-1 は現今用いられる抗腫瘍剤のいずれにも感受性を示さなかった。多剤耐性は悪性腫瘍に対する化学療法の大きな問題点で、特に MDR-1, MRP1, LRP は多剤耐性の重要因子である。DEOC-1 では原腫瘍に於けると同様、免疫組織化学染色で MDR1, MRP1, LRP の各蛋白が強く発現され、RT-PCR でそれらの mRNA 発現の増幅が示された。これらの知見は、MDR1, MRP1 および LRP が悪性黒色腫の多剤耐性に大きな役割を演じることを示している。

我々が樹立した細胞株は悪性黒色腫に有効な抗癌剤が未だ確立されていない現在、薬剤の開発を含め基礎的研究に有用であると考えられる。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	前 島 精 治
論文審査担当者		主 査 教 授 森 浩 志	
		副 査 教 授 清 金 公 裕	
		副 査 教 授 上 田 晃 一	
		副 査 教 授 芝 山 雄 老	
		副 査 教 授 田 窪 孝 行	
主論文題名			
Establishment and characterization of a cell line (DEOC-1) originating from a human malignant melanoma of the skin (ヒト皮膚悪性黒色腫由来培養細胞株 (DEOC-1) の樹立とその性状)			
論文審査結果の要旨			
<p>悪性黒色腫は現在選択可能な治療法に抵抗性の高度悪性腫瘍であり、基礎的研究のためにその細胞株の樹立が重要である。申請者はヒト悪性黒色腫細胞株(DEOC-1)の樹立に成功し、下記の細胞生物学的特性を明らかにした。すなわち①培養材料がヒト皮膚悪性黒色腫由来である。②84 ヶ月間、50 回以上にわたり継代可能である。③細胞異型を示し、接触阻止を示さず容易に重積する。④染色体検査では、核型がヒト型で異数性の分布をとる。⑤SCID マウスに移植可能で、原腫瘍と類似の腫瘍を形成する。⑥細胞質内にメラニン顆粒を有し 5-S-cysteinyl dopa (5-S-CD)を産生する、などの事実から、DEOC-1 がヒト皮膚悪性黒色腫由来培養細胞であることを確認している。さらに検討したすべての抗癌剤(ACD, ACNU, ADM, BLM,CBCDA, CDDP, CPM, DTIC, 5FU, MMC, MTX, VLB, VCR, VP-16)で、MTT assay 法による薬剤感受性を認めなかったこと、またこの細胞株について多剤耐性蛋白の検討を行ったところ、原腫瘍、異種移植腫瘍および DEOC-1 に MDR1, MRP1 および LRP の蛋白と mRNA の発現が認められたことを報告している。これらのことから申請者は MDR1, MRP1 および LRP が悪性黒色腫の多剤耐性に大きな役割を演じていると考えた。</p> <p>申請者が樹立した細胞株は悪性黒色腫に有効な抗癌剤が未だ確立されていない現在、薬剤の開発を含め基礎的研究に有用であると考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第3条第2項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものである。</p>			
(主論文公表誌)			
Human Cell 20 (2) : 23-38 , 2007			